

УДК 576.895.121 : 591.477

МОРФОЛОГИЯ КРЮЧЬЕВ СКОЛЕКСА
И ГЕНОСИСТЕМАТИКА *TRIAENOPHORUS NODULOSUS*
(CESTODA: PSEUDOPHYLLIDEA) ИЗ БАЙКАЛА

© О. Т. Русинек, К. Д. Кузнеделов

Впервые приводятся данные по морфологии крючьев сколекса (плероцеркоиды и половозрелые фазы развития) и геносистематике *Triaenophorus nodulosus* от рыб оз. Байкал.

Цестода *Triaenophorus nodulosus* — широко распространенный паразит рыб в оз. Байкал. Байкальский омуль *Coregonus autumnalis migratorius*, байкальский хариус *Thymallus arcticus baicalensis*, налим *Lota lota*, ленок *Brachymystax lenok*, щука *Esox lucius*, окунь *Perca fluviatilis*, елец *Leuciscus leuciscus baicalensis*, желтокрылка *Cottoscomorphus grewingkii*, длиннокрылка *C. inermis*, большеголовая широколобка *Batrachocottus baicalensis*, жирная широколобка *B. nicolskii*, пестрокрылая широколобка *B. multiradiatus*, песчаная широколобка *Cottus kesslerii*, каменная широколобка *Paracottus kneri*, большая красная широколобка *Procottus major*, большая голомянка *Cotmetphorus baicalensis*, малая голомянка *C. dybowskii*, новый вселенец в Байкал ротан-головешка *Percottus glehni* являются вторыми промежуточными хозяевами этого паразита (Ляйман, 1933; Догель, Боголепова, 1957; Заика, 1965; Пронина, Пронин, 1988; Пронин, 1991). Щука — окончательный хозяин паразита. Плероцеркоиды развиваются в печени рыб, а взрослые гельминты — в кишечнике щуки.

Целью данного исследования было изучить морфологию крючьев и геносистематику *Triaenophorus nodulosus* из некоторых видов бычковых рыб и половозрелых гельминтов из щуки оз. Байкал.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Материалы для данной работы собраны и обработаны в течение 1995—1999 гг. Сбор и обработка проб для морфологических исследований проведены по общепринятой методике (Быховская-Павловская, 1985). Для морфологических исследований использованы материалы по триенофоросу из желтокрылки, длиннокрылки, большеголовой широколобки и щуки. Морфологическое описание плероцеркоидов *Triaenophorus nodulosus* выполнено нами по размерным показателям от 16 гельминтов, выделенных из печени *Batrachocottus baicalensis*, и по 15 экз. также из печени — *Cottoscomorphus grewingkii* и *C. inermis* соответственно. Размеры крючьев взрослых червей описаны нами по 15 экз. *Triaenophorus nodulosus* из кишечника щуки.

Суммарную ДНК выделяли из фиксированных 96-градусным этиловым спиртом гельминтов методом, использованным ранее (de Vos, Dick, 1989).

ПЦР-амплификация. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) выполняли в 20—50 мкл реакционной смеси, содержавшей: 10 мМ Трис HCl буфер (рН 8.9); 4 мМ

$MgCl_2$; 40 мМ KCl; 0.1 мг/мл БСА; 0.2 мМ каждого: dATP, dCTP, dGTP и dTTP; 1 мКМ каждого праймера; 1—10 нг суммарной ДНК; 1—2 ед. акт. Таq-полимеразы. Амплификацию проводили 30-кратным повторением стадий в следующей последовательности: денатурация (94° , 60 с), отжиг (50 — 55° , 70 с) и полимеризация (72° , 120 с). Для амплификации выбранного фрагмента геномной ДНК использовали два праймера (Кузнеделов, 1995): 5'-TACCTGGTTGATCCTGCCAGTA-3' (прямой), 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGCACCC-3' (обратный) с координатами 1—22 и 630—610 относительно нуклеотидной последовательности 18S рРНК человека (Accession Number X03205).

Определение нуклеотидных последовательностей. ПЦР-продукты очищали гель-электрофорезом и выделяли, как описано ранее (Gyllensten, 1989). Полученные ПЦР фрагменты ДНК подвергали прямому секвенированию (Murray, 1989). Для этого кроме праймеров, использованных при ПЦР-амплификации, использовали внутренний праймер: 5'-GTTTCTCAGGCTCCCTCTC-3' (Kuznedelov, Timoshkin, 1993). Продукты секвенирующих реакций разделяли гель-электрофорезом в 8 %-ном полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевину, и радиоавтографировали в течение 12—24 ч при комнатной температуре.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей. Для сравнительного анализа были использованы последовательности представителей типа *Plathelminthes*, зарегистрированные в EMBL банке под номерами (accession number): L06567 — *Echinostoma caproni*, U27015 — *Echinococcus granulosus*, L06668 — *Fasciolopsis buski*, X55357 — *Opisthorchis viverrini*, M62652 — *Schistosoma mansoni*, а также последовательность *Armilla livanovi*, взятую из статьи Кузнеделова и др. (1996). Сравнительный анализ проводили путем вычисления эволюционных расстояний (количества различий) между последовательностями по методу Джукса и Кантора (Jukes, Cantor, 1969). Матрицу эволюционных расстояний, вычисленных при попарном сравнении, использовали для построения дендрограммы по методу Сайтоу и Нея (Saitou, Nei, 1987), отражающей степень сходства между сравниваемыми последовательностями.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что длина тела плероцеркоидов *Triaenophorus nodulosus* из байкальских рыб изменяется в довольно широких пределах и составляет 9.4—234.1 мм (табл. 1). По нашим материалам, наиболее крупные плероцеркоиды были отмечены у большеголовой широколобки, в 2 раза меньшего размера — у длиннокрылки и в 3 раза меньше — у желтокрылки. По литературным данным, длина плероцеркоида *T. nodulosus* из окуня составляет 7—39.5 мм (Пронина, Пронин, 1988); из пелагических бычков — 5—20 мм (Русинек, 1995). Такая значительная изменчивость признака может быть обусловлена разными сроками заражения рыб, размерами и возрастом рыб (длина тела, вес, уровень половой зрелости) и другими причинами. Как отмечалось ранее (Куперман, 1973), рост плероцеркоида *T. nodulosus* происходит на протяжении всего существования гельминта в дополнительном хозяине. Органы прикрепления *T. nodulosus* представлены формирующими на сколексе двумя псевдобротриями и двумя парами крючьев. По данным Купермана (1973), формирование крючьев *T. nodulosus* завершается на сороковой день развития плероцеркоида, и в дальнейшем их размеры остаются неизменными как на фазе плероцеркоида, так и у взрослых червей. По данным Евсеевой (1994), размеры крючьев *T. crassus* на фазе плероцеркоида остаются неизменными, однако автор отмечает, что при паразитировании гельминтов в окончательном хозяине возможно увеличение размеров крючьев по мере созревания червей. Поэтому мы сочли целесообразным привести данные о строении прикрепительного аппарата *T. nodulosus* как у плероцеркоидов, так и у половозрелых червей. Сопоставление полученных нами данных с параметрами крючьев *T. nodulosus*, представле-

Таблица 1
Размерные показатели (мм) плероцеркоидов *Triaenophorus nodulosus*
из разных хозяев

Table 1. Size characteristics (mm) of *Triaenophorus nodulosus* plerocercoids
from different hosts

Показатели	<i>C. grawingkii</i>	<i>C. inermis</i>	<i>B. baicalensis</i>
Длина тела	3.12—71.38 (32.24)	7.12—134.5 (56)	9.92—234.08 (92.63)
Наибольшая ширина тела	0.32—1.05 (0.66)	0.29—2.48 (0.775)	0.53—1.07 (0.685)
Ширина базальной пластиинки	0.06—0.098 (0.059)	0.062—0.089 (0.074)	0.059—0.149 (0.127)
Высота базальной пластиинки	0.012—0.042 (0.028)	0.018—0.04 (0.028)	0.018—0.033 (0.025)
Длина большого бокового зуба	0.04—0.085 (0.056)	0.027—0.093 (0.061)	0.04—0.082 (0.065)
Длина меньшего бокового зуба	0.023—0.067 (0.043)	0.02—0.084 (0.049)	0.031—0.065 (0.051)
Длина срединного зуба	0.018—0.038 (0.026)	0.014—0.036 (0.024)	0.021—0.034 (0.028)

Примечание. Здесь и в табл. 2: в скобках указаны средние значения признаков.

ными Дубининой (1987), позволило прийти к выводу, что как у плероцеркоидов, так и у половозрелых червей из байкальских рыб размеры крючьев соответствуют типичному описанию (табл. 2, рис. 1). Следует отметить, что размеры крючьев плероцеркоидов варьируют сильнее, чем таковые у половозрелых червей. Так, изменчивость ширины базальной пластиинки плероцеркоидов, по нашим данным, составляет по 16.5 %, а у взрослых червей — 4.7 %. По данным Евсеевой (1994), характер варьирования размеров крючьев *T. crassus* изменяется в зависимости от возрастной структуры хозяина. Максимальный размах изменчивости крючьев был отмечен у плероцеркоидов из рыб в возрасте 4+—5+, наименьший — из рыб младших и более старших возрастов. Возможно, это связано с тем, что в выборке присутствовали гельминты разных сроков заражения. Важно отметить, что предельные значения размеров прикрепительного аппарата *T. nodulosus* у плероцеркоидов выше, чем предельные значения размеров крючьев половозрелых червей. Пока мы воздерживаемся от конкретных выводов относительно этого факта, поскольку считаем, что в данном случае необходимо

Таблица 2
Основные размерные характеристики (мм) крючьев
Triaenophorus nodulosus (по литературным и нашим материалам)

Table 2. Principal hook size characteristics (mm)
of *Triaenophorus nodulosus* (according to references and our materials)

Хозяин (стадия развития паразита)	Дубинина, 1987	Наши данные
	<i>Exos lucius</i> (взрослые)	<i>Exos lucius</i> (взрослые)
Ширина базальной пластиинки	0.099—0.176	0.117—0.141 (0.126)
Высота базальной пластиинки	0.022—0.036	0.021—0.032 (0.025)
Длина большого бокового зубца	0.055—0.11	0.049—0.077 (0.065)
Длина меньшего бокового зубца	0.044—0.099	0.044—0.072 (0.055)
Длина срединного зубца	0.026—0.03	0.017—0.035 (0.025)

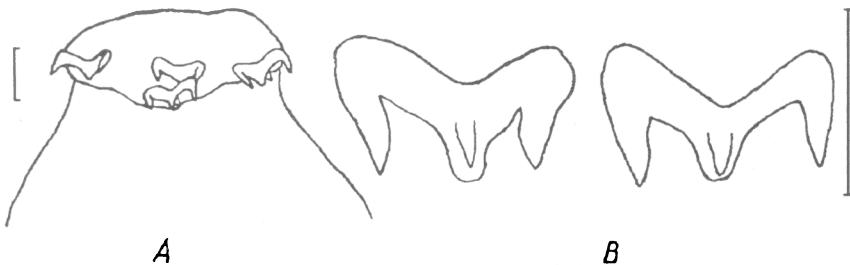


Рис. 1. *Triaenophorus nodulosus*.

А — сколекс; В — крючья.

исследовать эти признаки у червей из облигатных вторых промежуточных хозяев паразита, таких как окунь, песчаная широколобка. *Cottocotemphorus grewingki*, *C. inermis*, *Batrachocottus baicalensis* не являются облигатными дополнительными хозяевами *Triaenophorus nodulosus* в озере Байкал. Это связано с тем, что эти виды бычков живут в других экологических условиях, чем окончательный хозяин триенопфоруса — щука. Попадание в них паразита, скорее всего, происходит случайно, поскольку встреча этих бычков со щукой является маловероятным событием (за исключением района Малого Моря, где желтокрылки нерестятся и держится довольно много щук).

Таким образом, отсутствие стабильных экологических связей между дополнительными хозяевами *T. nodulosus* (*Cottocotemphorus grewingki*, *C. inermis*, *Batrachocottus baicalensis*) и окончательным хозяином *Esox lucius* свидетельствует о том, что обычно эти виды пространственно разобщены (щука обитает преимущественно в прибрежно-соровой зоне оз. Байкал, а бычки — в глубоководной части озера) (Сиделева, 1982), и поэтому паразит не может завершить свой жизненный цикл. В связи с чем данные виды бычковых рыб можно отнести к тупиковым хозяевам *Triaenophorus nodulosus*.

Определение нуклеотидной последовательности амплифицированного фрагмента рибосомной ДНК выявило 562 нуклеотидные позиции (рис. 2), идентифицированные с помощью известных последовательностей рДНК представителей типа Plathelmin-

```

ATATGTTGTCTAAAGATTAAGCCATGCATGTCTAAGTGCACGCCCTTATACGGTGAAA 60
CCCGAATGGCTCATTAATCAGCTATGGTTACTGGATCGTACCCGTTAAATGGATAAC 120
TGTAATAACTCTAGAGCTAATACATGCCACGAAGCCCTGACCCGCAAGGAATGGTGCA 180
CTTATTAGATCAGAACCAACCAGGTGCCGGTCGCAAGACTGGTGCTGCTGTCGTTCTG 240
GTGACTCTCGATAATTGTTACAGATCGCAGTCGGCCTTGAGTCGGCGACGGGTCTCAA 300
ATGTCTGCCCTATCAACTTCTGATGGTAGGTGATCTGCCCTACCATGGTGATAACGGTAA 360
CGGGGAATCAGGGTCGATTCCGGAGAGGGAGGCCTGAGAAACGGCTACCACTTCCAAGGG 420
AGGCAGCAGCGCGCAAATTACCCACTCCAGTACGGGGAGGTGGTGACGAAAAATACCG 480
ATGCGGGACTCCCAAACGAGGCTCCGTAATCGGAATGAGTGAAATATAATCCTTCACG 540
AGGATCAATTGGAGGGCAAGTC 562

```

Рис. 2. Набор нуклеотидных последовательностей, кодирующих 5'-концевую область 18S рРНК *Triaenophorus nodulosus* из оз. Байкал.

Fig. 2. The nucleotide sequences of the 5'-end portion of 18S rRNA gene from representatives of *Triaenophorus nodulosus* from Baikal.

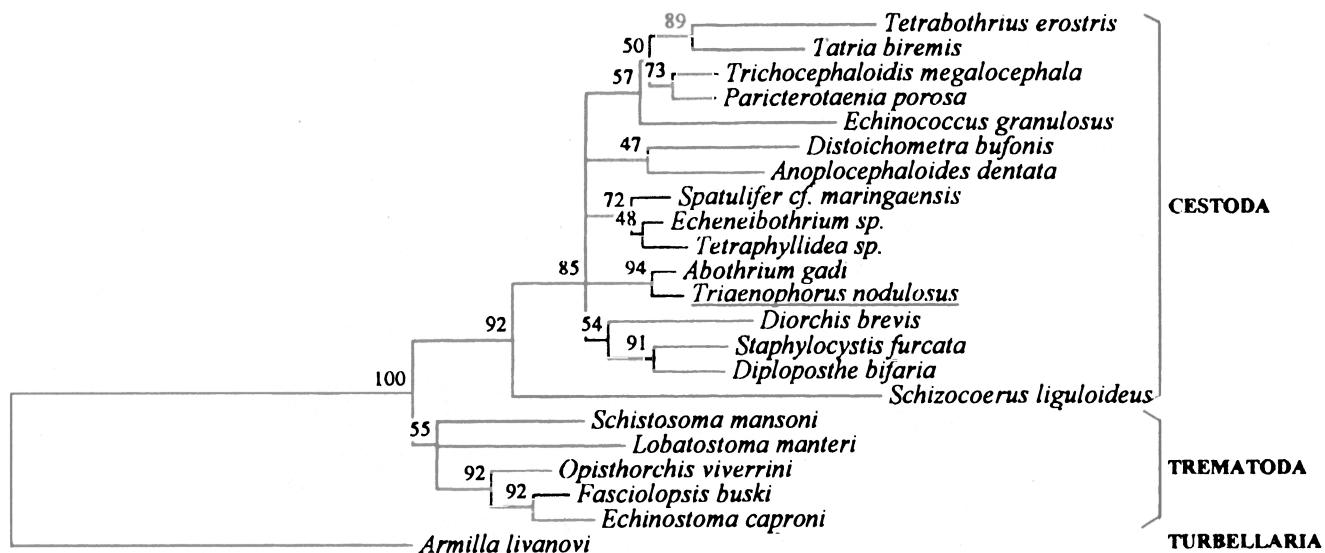


Рис. 3. Консенсусное филогенетическое дерево. Числа выражают вероятности (в %) появления групп видов, стоящих справа по дереву от этих чисел в бутстрэп-анализе.

Fig. 3. Unrooted consensus tree. The numbers mean bootstrap values of internal branches.

hes. Фрагмент гена 18S рРНК *Triaenophorus nodulosus* длиной 429 пар нуклеотидов, зарегистрированный в банке данных под номером Z98404 (Mariaux J., Museum d'Histoire Naturelle de Geneva, 1997), соответствует участку с координатами 35 и 464 относительно последовательности, представленной на рисунке, и идентичен ему на этом участке. Для установления степени родства с другими цестодами проводили сравнительный анализ с известными последовательностями гена 18S рРНК не только цестод, но и трематод. Результаты сравнительного анализа представлены на дендрограмме (рис. 3). Из нее следует, что полученная нуклеотидная последовательность группируется с последовательностями, относящимися к классу Cestoda, и наиболее близка к таковой *Abothrium gadi*. Как и *Triaenophorus nodulosus*, этот паразит относится к отряду Pseudophyllidea, но к другому надсемейству Amphicotyloidea. По мнению Протасовой (1977), эти группы паразитов представляют собой две эволюционные ветви в развитии представителей этого отряда.

Авторы выражают благодарность ФЦП «Интеграция» № 193 (К0998), поддержавшей данное исследование, а также студентам Иркутского государственного университета Басаргиной А. А., Крицкой У. А., Русинек Е. В., принимавшим участие в сборе и обработке материалов.

Список литературы

Быховская-Павловская И. Е. Паразиты рыб. Руководство по изучению. Л.: Наука, 1985. 121 с.

Догель В. А., Боголепова И. И. Паразитофауна рыб оз. Байкал // Тр. Байкал. лимнол. станции. 1957. Т. 15. С. 427—464.

Дубинина М. Н. Класс ленточные черви — Cestoda // Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Т. 3. Паразитические многоклеточные (вторая часть). Л.: Наука, 1987. С. 46—49.

Евсеева Н. В. Возрастная изменчивость крючьев цестоды *Triaenophorus nodulosus* Forel, 1886 // Экологическая паразитология. Петрозаводск: Изд-во КНЦ Ин-та биологии РАН, 1994. С. 125—133.

Заика В. Е. Паразиты рыб озера Байкал. М.: Наука, 1965. 107 с.

Куперман Б. И. Ленточные черви рода *Triaenophorus* — паразиты рыб. Л.: Наука, 1973. 207 с.

Кузнеделов К. Д. Филогенетический анализ турбеллярий озера Байкал, основанный на сравнении 5'-концевых последовательностей гена 18S рибосомальной РНК: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. ИЦИГ. Новосибирск: Изд-во ИЦИГ, 1995. 17 с.

Кузнеделов К. Д., Тимошкин О. А., Кумарев В. П. Молекулярная филогения планарий (Turbellaria, Tricladida, Paludicola) озера Байкал, установленная сравнительным анализом нуклеотидных последовательностей 18S рибосомной РНК // Молекулярная биология, 1996. Т. 30, вып. 6. С. 1316—1325.

Лайман Э. М. Паразитические черви озера Байкал // Тр. Байкал. лимнол. станции. 1933. Т. 4. С. 5—98.

Пронин Н. М. *Triaenophorus nodulosus* (Pallas, 1781) // Динамика зараженности животных гельминтами. Улан-Удэ: БНЦ СО АН СССР, 1991. С. 12—49.

Пронина С. В., Пронин Н. М. Взаимоотношения в системах гельминты—рыбы. М.: Наука, 1988. 176 с.

Протасова Е. Н. Ботриоцефалии — ленточные гельминты рыб. М.: Наука, 1977. 298 с.

Русинек О. Т. Паразиты пелагических бычковых рыб // Атлас пелагобионтов Байкала. Новосибирск: Наука, 1995. С. 541—581.

Сиделева В. Г. Сейсмосенсорная система и экология байкальских подкаменщиковых рыб (Cottoidei). Новосибирск: Наука, 1982. 147 с.

de Vos T., Dick T. A. 1989. Differentiation between *Diphyllobothrium dendriticum* and *D. latum* using isozymes, restriction profiles and ribosomal gene probes // Syst. Parasitol. Vol. 13. P. 161—166.

Kuznedelov K. D., Timoshkin O. A. 1993. Phylogenetic relationships of Baikalian species of Prorhynchidae turbellarian worms as inferred by partial 18S rRNA gene sequence comparisons // Mol. Marine Biol. and Biotechnol. Vol. 2. P. 300—307.

Gyllensten U. Direct sequencing of in vitro amplified DNA // PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification. N. Y.: M. stockton press, 1989. P. 45—60.

Jukes T. H., Cantor C. R. Evolution of protein molecules // Mammalian Protein Metabolism. N. Y.: Academic Press, 1969. P. 21—132.

Murray V. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction // Nucleic Acids Res. 1989. Vol. 21. P. 88—89.

Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. 1987. Vol. 4. P. 406—425.

Лимнологический институт СО РАН,
Россия, Иркутск, 664033

Поступила 9.03.2000

STRUCTURE OF SCOLEX HOOKS AND GENE SYSTEMATICS
OF TRIAENOPHORUS NODULOSUS (CESTODA: PSEUDOPHYLLIDEA)
FROM THE BAIKAL LAKE

O. T. Rusinek, K. D. Kuznedelov

Key words: Cestoda, *Triaenophorus nodulosus*, morphology, gene systematics, Baikal Lake.

SUMMARY

Data on a hook morphology (in plerocercoid and mature helminths) and gene systematics of *Triaenophorus nodulosus* from the Baikal Lake are presented for the first time. Sequence analysis of rDNA fragments (5'-end portion of 18S rDNA) yielded 562 nucleotid positions.